



Warszawa, 29.10.2024

dr hab. Elżbieta Nowak  
Laboratorium Struktury Białka  
Międzynarodowy Instytut Biologii  
Molekularnej i Komórkowej w Warszawie  
e-mail: [enowak@iimcb.gov.pl](mailto:enowak@iimcb.gov.pl)  
tel.: (48) 22 5970721

**Recenzja pracy doktorskiej Pana mgra Wojciecha Witka, pt.: „Structural biology of the histidine biosynthetic pathway in plants”**

Niniejsza recenzja dotyczy pracy doktorskiej wykonanej pod kierunkiem dra hab. Miłosza Ruszkowskiego w Zakładzie Biologii Strukturalnej Eukariontów Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk.

Badania, które Doktorant opisał w przedstawionej rozprawie, dotyczą strukturalnej charakterystyki enzymów uczestniczących w wieloetapowym procesie biosyntezy histydyny u *Medicago truncatula*. O istotności szlaku biosyntezy histydyny, którego występowanie cechuje prokarioty, grzyby oraz rośliny, świadczy przede wszystkim ekspresja genów kodujących białka wchodzące w skład opisywanego szlaku zachodząca we wszystkich tkankach rośliny, a także negatywny wpływ hamowania aktywności enzymów odpowiadających za jego przebieg na rozwój lub przeżywalność organizmu. Jednocześnie szlak ten nie występuje u zwierząt, co czyni go relatywnie bezpiecznym celem dla małowiązanych inhibitorów, aktywnych względem enzymów występujących u pogarszających plony chwastów. Tego typu herbicydy mogą wykazywać mniejszą toksyczność dla konsumenta, niemniej, flora jelitowa zwierząt pozostaje narażona na ich działanie i dlatego istotne jest poszukiwanie takich ich wariantów, które selektywnie oddziaływałyby na roślinne enzymy szlaku biosyntezy histydyny. Aby to umożliwić, niezbędne jest poznanie budowy enzymów stanowiących cel molekularny i porównanie ich do odpowiedników, które na działanie małowiązanych inhibitorów miałyby pozostawać niewrażliwe.

Roślinny szlak biosyntezy histydyny składa się z jedenastu etapów, za których przebieg odpowiada osiem enzymów (HISN1-HISN8), w tym - stanowiące przedmiot rozprawy – białka HISN5 oraz HISN2, HISN3 i HISN6, których struktury są pierwszymi opublikowanymi dla enzymów roślinnych. Jest to istotne w kontekście większości dotychczasowych badań procesu biosyntezy histydyny, dotyczących przede wszystkim systemów prokariotycznych. Choć wykazują one liczne podobieństwa do analogicznych szlaków spotykanych u eukariontów, to dzięki badaniom opublikowanym przez Doktoranta w załączonych do rozprawy pracach, możliwe było określenie nie tylko różnic strukturalnych, ale także określenie ich pochodzenia ewolucyjnego.

Innym aspektem poznania struktury roślinnych enzymów szlaku biosyntezy histydyny jest identyfikacja mechanizmów odpowiadających za zwiększenie aktywności tych białek. Dzięki temu możliwe byłoby wywieranie kontrolowanego wpływu na proces powstawania aminokwasu, którego imidazolowy łańcuch boczny wykazuje zdolność kompleksowania jonów metali, w tym jonów metali ciężkich. Mechanizm ten jest niezwykle istotny z punktu widzenia bioremediacji gleb, a także redukcji negatywnego wpływu jonów dwuwartościowych, mogących akumulować się w roślinach uprawnych.

Wyżej wymienione przykłady podkreślają wielowymiarowość zagadnienia, którego bliższego poznania, m.in. od strony analizy strukturalnej, podjął się Doktorant w trakcie przeprowadzonych przez Niego badań opisanych w czterech załączonych do rozprawy publikacjach. Niniejsze, siedemdziesięciostronicowe opracowanie przygotowane przez mgra Witka jest bardzo przejrzyste, spójne, a jego wersja elektroniczna dodatkowo wzbogacona jest o praktyczny sposób nawigacji, który pozwala przenosić się od rysunku w danej publikacji do tego miejsca w tekście rozprawy, który go bezpośrednio dotyczy. Umożliwia to płynne poruszanie się po treści pracy i bardzo korzystnie wpływa na utrzymanie ciągłości narracji.

Rozprawa mgra Witka została napisana w j. angielskim i składa się z dwóch głównych części:

- 1) zwięzłego opisu tematyki badań;
- 2) załączników w postaci czterech publikacji będących efektem prac badawczych mgra Witka w ramach projektu Doktorskiego. W trzech z nich Doktorant jest Autorem wiodącym i moja uwaga skupia się na nich. Każda z tych prac została poddana wnikliwej analizie przez co najmniej dwóch recenzentów, dlatego też zrezygnuję z ich szczegółowej oceny. Ponadto w części tej znajdują się oświadczenia, dotyczące wkładu Autora w ich przygotowanie.

Pierwsza z wymienionych części podzielona jest na kilka rozdziałów, w tym: listę publikacji, konferencji oraz warsztatów, w których mgr Witek brał udział, wykaz struktur enzymów będących przedmiotem badań, streszczenie w języku angielskim i polskim, wstęp do tematyki badań, opis ich znaczenia, celu rozprawy doktorskiej, a także z listy wykorzystanych metod oraz technik, skrótowego przedstawienia głównych tez i wyników opisanych w załączonych publikacjach, ogólnych wniosków, planowanych badań oraz spisu literatury. Wrażenie z zapoznania się z tą częścią pracy jest bardzo pozytywne, gdyż Doktorant w sposób esencjonalny odniósł się do najważniejszych aspektów swoich badań oraz uzyskanych wyników. Opisy następują po sobie nieprzypadkowo, narracja utrzymuje ciągłość, a każdy z zawartych elementów stanowi integralną całość i konsekwencję poprzedzającej treści.

Załączone w drugiej części publikacje, których mgr Witek jest współautorem, dotyczą w dużej mierze badań strukturalnych wybranych enzymów (HISN2, HISN3, HISN5 i HISN6) wchodzących w skład szlaku biosyntezy histydyny u *M. truncatula*. Ich konsekwencją są opisy mechanizmów oddziaływania wymienionych białek z substratami/produktami reakcji, a także oparte na nich próby zdefiniowania metodami *in silico* potencjalnych inhibitorów, których selektywne działanie mogłoby hamować aktywność enzymatyczną białek występujących u spokrewnionych gatunków roślin.

Dodatkowo w załączonych publikacjach badana jest filogeneza enzymów HISN2, HISN3, HISN5 i HISN6. Są to solidnie wykonane i bardzo dobre prace.

W pierwszej pracy (opublikowanej w *Scientific Reports*) Doktorant wraz ze współautorami opisuje strukturę enzymu HISN2 (również w kontekście jego bakteryjnego odpowiednika, tj. białka HisIE), który u *M. truncatula* dwuetapowo katalizuje konwersję fosforybozylo-ATP do fosforybozylo-AMP i następujące potem otwarcie pierścienia adeniny. Kompleks HISN2-AMP jest szczególnie interesujący z uwagi na proponowany mechanizm regulacji aktywności tego enzymu poprzez oddziaływanie AMP z domeną PRA-CH. Wcześniej hamowanie aktywności enzymów szlaku biosyntezy histydyny związane z oddziaływaniem z AMP wykazano tylko dla białka HISN1. Przykład HISN2 jest zatem drugim punktem w tym szlaku biosyntetycznym, w którym wysoka podaż produktu hydrolizy ATP, odzwierciedlająca stan metaboliczny komórki, może wpływać na spowolnienie procesu powstawania histydyny. Ponadto, oddziaływanie z AMP ułatwiać może brak przenoszenia produktu pośredniego, tj. PR-AMP z domeny PRA-PH, odpowiedzialnej za hydrolizę trifosforanu w substracie PR-ATP, do miejsca katalitycznego domeny PRA-CH. Konieczność uwolnienia PR-AMP postulowana jest przez autorów pracy w oparciu o analizę przeprowadzoną przy użyciu modułu CAVER 3.0 (PyMOL), która wykazała brak obecności typowego dla niektórych hydrolaz kanału, umożliwiającego bezpośrednie przenoszenie produktu pośredniego między domenami katalitycznymi. Niemniej, w badaniach strukturalnych opublikowanych w tej pracy nie występuje tego typu kompleks, co może mieć związek z niską stabilnością PR-AMP i wynikającą z tego faktu trudnością w uzyskaniu kryształów białka.

Problem stabilności lub handlowej niedostępności substratów, stanowiących jednocześnie ligand do ko-kryształacji enzymów szlaku biosyntezy histydyny, Doktorant rozwiązał w przypadku białka HISN3, którego opis zawarty został w drugiej z załączonych publikacji. Enzym ten odpowiada za proces izomeryzacji ProFAR do PrFAR i by umożliwić podjęcie prób uzyskania kryształów HISN3 w kompleksie z ProFAR oraz przeprowadzenie doświadczeń dotyczących aktywności tego białka mgr Witek opracował enzymatyczny proces syntezy substratu. Do aktywności HISN3 niezbędne są jony  $Mg^{2+}$  oraz  $Na^+$ , jednakże kinetyka reakcji w obecności EDTA nie wykazywała różnic względem katalizy bez dodatku czynnika chelatującego. Usunięcie regionu  ${}_{74}LKDDDGS_{80}$ , który Doktorant zidentyfikował na podstawie analizy porównawczej struktury HISN3 i jej bakteryjnych odpowiedników, jako potencjalnie biorącego udział w oddziaływaniu z jonami  $Mg^{2+}$ , spowodowało 12-krotny spadek  $k_{cat}$  względem białka dzikiego. Tu pojawia się pytanie, czy usunięcie tego fragmentu nie wpłynęło na strukturę białka? Być może przeprowadzenie analogicznego doświadczenia z wykorzystaniem muteiny, w której zastąpiono by reszty kwasu asparaginowego resztami asparaginy lub innego aminokwasu, dałoby większą pewność, że spadek aktywności enzymu nie jest efektem zbyt znaczącej ingerencji w ciągłość łańcucha polipeptydowego? Białko HISN3 pośrednio uczestniczy również w syntezie puryn, jako, że PrFAR stanowi substrat do produkcji kluczowego komponentu tego szlaku: rybonukleotydu 5-aminoimidazolo-4-karboksyamidowego (AICAR). To sprawia, że HISN3 jest atrakcyjnym celem do

projektowania małowcząsteczkowych związków, które mogłyby hamować nie tylko szlak biosyntezy histydyny, lecz również powstawanie PrFAR, a przez to także AICAR.

Również w trzeciej pracy mgr Witek uczestniczył w opracowaniu metody *in vitro* umożliwiającej pozyskanie substratu (IGP) dla piątego enzymu roślinnego szlaku biosyntezy histydyny, tj. HISN5. Publikacja ta zawiera już nie tylko struktury krystaliczne badanych białek, ale również struktury cryoEM, co dowodzi, że Doktorant miał możliwość rozszerzenia znajomości metodyki z dziedziny badań strukturalnych. W połączeniu z rozwiązaniem zestawem wysokorozdzielczych struktur krystalicznych, możliwe było określenie regionów 24-podjednostkowego HISN5 kluczowych z punktu widzenia oddziaływania z jonami  $Mn^{2+}$  oraz ich orientacji względem centrum aktywnego, a następnie przeprowadzenie wirtualnych badań przesiewowych (ang. virtual screening), mającego na celu określenie struktur potencjalnych inhibitorów HISN5. Analiza filogenetyczna wykazała ponadto, że białko to jest dalece spokrewnione z enzymami występującymi u grzybów i bakterii, co może okazać się korzystne dla wytypowania inhibitorów specyficznych tylko względem roślinnych ortologów HISN5.

W pracy pojawiają się pojedyncze błędy edytorskie np.: „reagents” zamiast np. „substrates” (strona 16), podwójne użycie „this” (strona 23), nie powinno być spacji po „N1-” (strona 38), (strona 47) powinno być „HISN6”, a nie „HISN3”, „suggest” zamiast „suggests” (strona 51). Niemniej są to sporadyczne przypadki, a całość opracowana jest z dużą dbałością nie tylko o kwestie merytoryczne, ale również dotyczące poprawności językowej, właściwego stosowania skrótów, interpunkcji czy odniesień. Przede wszystkim jednak wykonane i opisane przez Doktoranta doświadczenia doprowadziły do uzyskania wyników, które w sposób istotny wzbogaciły dotychczasowe badania nad szlakiem biosyntezy histydyny. Zaniedbywany w ostatnim czasie obszar dotyczący powstawania tego aminokwasu u eukariontów zyskał uzupełnienie nie tylko biochemiczne, ale również strukturalne. Wkład wniesiony dzięki badaniom Doktoranta nie ogranicza się tylko do kwestii praktycznych, związanych z uprawą roślin czy wydajniejszą bioremediacją, jako że dostarczył On także nowych informacji na temat pochodzenia ewolucyjnego wybranych białek szlaku biosyntezy histydyny. Ponadto, mgr Witek opracował metody enzymatycznej syntezy substratów, biorących udział w opisywanym procesie, co stanowi istotną pomoc dla innych grup badawczych zainteresowanych tą tematyką w lepszym poznaniu mechanizmów katalizy, regulacji i monitorowania aktywności enzymów szlaku biosyntezy histydyny. W związku z powyższym całość pracy oceniam bardzo wysoko.

Zapoznanie się z treścią rozprawy doktorskiej mgra Wojciecha Witka nasunęło mi kilka pytań:

1. Część badań i analiz przeprowadzonych przez Doktoranta skupiona była na próbach wytypowania związków małowcząsteczkowych, będących potencjalnymi inhibitorami enzymów wchodzących w skład szlaku biosyntezy histydyny. Czy prowadzone były analogiczne poszukiwania dotyczące związków, które mogłyby działać jako aktywatory tych białek? Który lub które z etapów roślinnego szlaku biosyntezy histydyny (mam na myśli dowolny z ośmiu

enzymów odpowiedzialnych za syntezę tego aminokwasu) brano by pod uwagę jako najlepszy cel działania aktywatora i dlaczego?

2. Czy badane były zmiany poziomu ekspresji genów występujące na skutek aktywacji lub inhibicji ww. etapów opisywanego szlaku biosyntetycznego?
3. W jaki sposób można by rozwiązać problem inhibicji dwóch pierwszych enzymów szlaku przez AMP, a także hamowania aktywności samego HISN1 przez finalny produkt biosyntezy, tj. histydynę?

Podsumowując, przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.), Ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.) oraz w Sposobie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (uchwała Rady Naukowej ICHB PAN nr 28/2024/Internet z dnia 20 marca 2024 r.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie mgra Wojciecha Witka do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora. Ponadto, z uwagi na istotność zagadnienia, które jest przedmiotem rozprawy, kreatywność i dojrzałość badawczą oraz szeroki zakres opanowanej przez Doktoranta metodologii wnioskuję o wyróżnienie niniejszej rozprawy.

Elżbieta Nowak